

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Keemis Instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

RAINER ELP

Tsüklilise adenosiinmonofosfaadi biosensori arendamine

Bakalaureusetöö

Juhendaja : Olga Mazina, MSc

Tartu 2015

KASUTATUD LÜHENDID

AC	-	adenülaadi tsüklaas
ATP	-	adenosiintrifosfaat
BRET	-	bioluminestsents resonantsenergia ülekanne
BSA	-	veise seerum albumiin (<i>Bovine serum albumin</i>)
C	-	tsütosiin
cAMP	-	tsükliline adenosiin-3'-5'-monofosfaat
CFP	-	helesinine fluorestseeruv valk (<i>Cyan Fluorescent Protein</i>)
cGMP	-	tsükliline guoanisiin-3'-5'-monofosfaat
Clover	-	roheline fluorestseeruv valk
cNGC	-	tsükliliste nukleotiidide poolt reguleeritud ioonkanalid
cp173 ^{Venus}	-	tsirkulaarselt permuteeritud kollane fluorestseeruv valk
CRE	-	cAMP vastus-element (<i>cAMP Response Element</i>)
DNA	-	desoksüribonukleiinhape
E. coli	-	<i>Escherichia coli</i> , gram-negatiivne soolebakter
EDTA	-	etüleendiamiintetraatsetaat
Epac	-	cAMP efektorvalk (<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>)
FP	-	Fluorestsents polarisatsioon
FRET	-	Förster resonantsenergia ülekanne
G	-	guaniin

GDP	-	guanosiidifosfaat
GFP	-	roheline fluorestseeruv valk (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPCR	-	G-valk seotud retseptor
GTP	-	guanosintrifosfaat
G-valk	-	guaniinnukleotiide siduv regulaatorvalk
LB	-	bakterisööde (<i>Luria Bertani</i>)
mRuby2	-	punane fluorestseeruv valk
mTyquoise	-	helesinine fluorestseeruv valk
PCR	-	polümeraas ahelreaktsioon (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	-	fosfodiesteraas
PKA	-	cAMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas A
RET	-	resonantseenergia ülekanne
RNA	-	ribonukleiinhape
SAP	-	aluseline fosfataas (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
SOC	-	bakterisööde (<i>Super Optimal Broth</i>)
TAE	-	Tris-äädikhape-EDTA puhver
T _m	-	praimerite sulamistemperatuur
Tris	-	tris(hüdroksümetüül)aminometaan
YFP	-	kollane fluorestseeruv valk (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)

SISUKORD

SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
G-vlaguga seotud retseptorid ning signaalülekanne	6
cAMP kui sekundaarne virgatsaine	6
cAMP-i määramise meetodid	7
Fluorestsentsil põhinevad biosensorid	9
FRET-l põhinevad cAMP biosensorid	11
Biosensorites kasutatavate fluorestsentsvalkude areng	13
EKSPERIMENTAALOSA	16
Aparatuur ja materjalid	16
DNA fragmentide paljundamine	17
Geelelektroforees	18
Restriksioon ja ligeerimine	18
Rakkude transformeerimine	19
TULEMUSED JA ARUTELU	21
Kloonimise strateegia ja praimerite disain	21
Doonori mTyrquoise vahetamine Cloveri vastu	22
Aktseptori dVenuse vahetamine mRuby2 vastu	24
Clover-Epac-mRuby2 testimine	26
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
KASUTATUD KIRJANDUS	29

SISSEJUHATUS

Organismide funktsioneerimisel on oluline rakkudevaheline infovahetus. Raku pinnal on palju erinevaid retseptorvalke, mis tuvastavad rakuväliseid molekule ja aktiveerivad erinevaid signaalradasid. G-valguga seotud retseptorid (GPCR) on üks enim levinud retseptorite klass ning enam kui veerand tänapäeva ravimitest on suunatud just GPCR-le. Tsükliline adenosiinmonofosfaat (cAMP) on laialt levinud sekundaarne virgatsaine, mis on seotud paljude GPCR süsteemide aktiveerimisega. Kuna cAMP on paljude GPCR-de vahendatud signaalide edasikandja rakus, sobib cAMP taseme muutuste jälgimine nenderetseptorite iseloomustamiseks.

Försteri resonantsenergia ülekandel (FRET) põhinevad biosensorid võimaldavad määrata cAMP kontsentratsiooni muutust rakkudes. Sellised sensorid koosnevad erinevatest fluorestseeruvatest valkudest ning cAMP siduvast peptiidijärjestusest. cAMP seostumisel biosensorile selle fluorestsentsomadused muutuvad. Mõõdetud muutused fluorestsentsintensiivsuse signaalis on võrdelised cAMP taseme muutusega rakus.

Fluorestsents valkude arenguga kaasneb ka uute, efektiivsemate biosensorite loomise võimalikkus. Käesoleva töö eesmärgiks on konstrueerida FRET-l põhinev uus biosensor, mis võimaldab tundlikumalt detekteerida cAMP kontsentratsiooni muutust rakus. Rakendades sellist biosensorit GPCR aktivatsiooni jälgimiseks on võimalik määrata retseptorile seostuvate ühede bioloogilist aktiivsust.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

G-valguga seotud retseptorid ning signaalülekanne

Raku pinnal asetsevad retseptorid, mis reageerivad erinevatele stiimulitele ning seetõttu tagavad rakkudevahelise infovahetuse. GPCR-d moodustavad suurima membraanseotud retseptorite perekonna, mis tuvastavad rakuvälise molekuli ja aktiveerivad rakusiseseid signaalülekanne radasid, mille tõttu saadakse bioloogiline tagasiside, muutus rakus. GPCR-eid seostatakse paljude haigustega ning need on enam kui veerand ravimite märklauaks (Overington *et al.* 2006, Filmore *et al.* 2004). GPCR-idele on omane seitse korda membraani läbiv heeliks, mis on ühendatud rakusiseste ning -välise aasadega, mille struktuurid on väga erinevad ning võimaldavad seega siduda spetsiifilisi ligande (Lehninger, 2005).

Rakkude sisemuses asuvad kolmest alaühikust (α , β , γ) koosnevad guaniinnukleotiide siduvad G-valgud, millel on oluline roll retseptori poolt vastu võetud signaali edasikandmisel. GPCR aktiveeritakse ligandi abil, mille tagajärjel toimub retseptorvalgus konformatsioonimuutus ning G-valk aktiveerub ning α -alaühiku poolt seotud guanosiidifosfaat (GDP) asendub guanosintrifosfaadiga (GTP). Järgnevalt dissotsieerub G-valk kaheks osaks, α -alaühikuks (koos GTP-ga) ja $\beta\gamma$ dimeeriks, ning mõlemad saavad mõjutada rakusiseseid signaalmolekule või sihtmärke (Wettschureck *et al.* 2005). α -alaühiku põhjal saab G-valgud jaotada neljaks: G_s , mis stimuleerib ensüümi adenülaadi tsüklaasi (AC); G_i , mis inhibeerib AC-i või aktiveerib kaaliumiioonkanaleid; G_q , mis aktiveerib ensüümi fosfolipaas C, ning G_o , mis aitab närvirakkudes sulgeda kaltsiumi kanaleid (Patrick, 2013). Signaalirajad võivad olla seotud erinevate sekundaarsete virgatsainetega, näiteks tsükliline adenosiinmonofosfaat (cAMP), tsükliline guanosiinmonofosfaat (cGMP) ja Ca^{2+} .

cAMP kui sekundaarne virgatsaine

cAMP on laialdaselt uuritud sekundaarne virgatsaine, mis reguleerib arvukalt keerulisi bioloogilisi protsesse, nagu mälu tugevdamist, immuunsüsteemi, insuliini reguleerimist ja südamelöögi sagedust (Gancedo, 2013). cAMP-i sünteesitakse rakus ATP-st ensüümi adenülaadi tsüklaasi kaasabiga, mille enamik alatüüpe paiknevad plasmamembraanis. G_s ja G_i valgud reguleerivad rakus cAMP kontsentratsiooni, vastavalt kas aktiveerides või inhibeerides ensüümi

adenülaadi tsüklaasi. Rakusisene cAMP kontsentratsioon on määratud cAMP sünteesist ja lagunemisest, vastavalt adenülaadi tsüklaasi ja fosfodiesteraaside (PDE) aktiivsusest (Patrick, 2013).

cAMP väljendab oma rakulisi signaale läbi kolme põhilise efektorvalgu: cAMP-sõltuv proteiinkinaas ehk proteiinkinaas A (PKA), tsükliliste nukleotiidide poolt reguleeritud ionkanalid (cNGC) ja Epac- Valk (*exchange protein directly activated by cAMP*), mis on otseselt cAMP-reguleeritud.

Enamik cAMP-ga seotud efektidest on vahendatud valkude fosforüleerimise kaudu, eelkõige PKA kaudu (Gancedo, 2013). Nelja cAMP molekuli seostumise tagajärjel ensüüm dissotsieerub reguloorsetest alaühikutest (R) koosnevaks dimeeriks ja kaheks katalüütiliselt aktiivseks (C) alaühikuks. Katalüütilise aktiivsusega alaühikud on võimelised fosforüleerima seriini ja treoniini jääke tsütoplasmas ja raku tuumas asuvates rohketes substraatvalkudes. PKA klassifitseeritakse vastavalt R-alaühikute erinevustele kahte põhiklassi: PKA(I) ja PKA(II). R-alaühikute isovormid on kudedes erineva ekspressiooniga. PKA(I) on tsütosoolne ensüüm ja PKA(II) asub rakusisestes piirkondades, mistõttu paiknevad kinaasi molekulid raku endi efektorite lähedal, võimaldades selliselt ajalist ning ruumilist PKA signaalülekande regulatsiooni (Cheng *et al.* 2008).

Samuti oluliseks cAMP sihtmärgiks on Epac Valk, mille ülesandeks on G-valkude perekonda kuuluvate Ras-valkude (GTP-aasid) aktiveerimine (Cheng *et al.* 2008). Epac valke on kahte tüüpi: Epac1, millel on üks tsüklilist nukleotiidi siduv domeen, ja Epac2, kahe sellise sidumiskohaga. Epac2 valgu kaks siduvat domeeni erinevad oluliselt sidumisafiinsuselt cAMP suhtes, K_d vastavalt 0,5 ja 76 μM . Teine domeen on väga madala afiinsusega ning seetõttu on sellele spekulatsioonid pigem reguloorset rolli (de Rooij *et al.* 2000). Epac1 cAMP sidumisdomeeni K_d on 2,8 μM (de Rooij *et al.* 2000). G-valgud on kui molekulaarsed lülid, mis kontrollivad mitmeid rakuprotsesse, nagu rakkude jagunemine ja südametöö (Siegel *et al.* 2006).

cAMP-i määramise meetodid

Ühe levinud meetodinakasutatakse radioaktiivselt märgistatud lähteainet. Rakkudele lisatakse eelnevalt [^3H] märgistatud adeniini nukleotiidi. [^3H]-cAMP-i eraldamiseks teistest triitium-märgistatud adeniini derivaatidest, kasutatakse kolonnkromatograafiat. Selliselt on

võimalik määrata tekkinud [^3H]-cAMP hulk rakkudes. Antud meetodi eelisteks on lai dünaamiline määramisala ning suur tundlikkus – nanomolaarsel tasandil (Donaldson *et al.* 1988). Väga levinud on ka [^3H]-cAMP konkureerival sidumisel põhinev meetod. Rakus sünteesitud cAMP konkureerib [^3H]-cAMP-ga seostumisel kindlate omadustega valgule (nt. PKA), mis moodustab kompleksi vaid cAMP-ga. Radioaktiivse kompleksi hulk on otseselt sõltuv rakus sünteesitud cAMP ja [^3H]-cAMP vahekorra, seega mida vähem cAMP-i on rakus sünteesitud, seda rohkem radioaktiivset kompleksi tekib. Meetodi eeliseks on samuti lai määramisala ning suur tundlikkus – pikomolaarsel tasandil (Gilman *et al.* 1970).

Eelnevale meetodile on sarnane radioimmuunanalüüs (RIA). Tsüklilise adenosinmonofosfaadi kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse cAMP-vastaseid antikehasid ja radioaktiivselt märgistatud [^{125}I]-cAMP'i. Lahuses olev cAMP konkureerib radioaktiivselt märgistatudvirsatsinega cAMP-vastasele antikehale sidumisele, mistõttu väheneb antikehadega seotud radioaktiivselt märgistatud molekulide osakaal. Radioaktiivset cAMP-i, mis on seotud antikehaga, saab mõõta ioniseeriva kiirgusega ergastamisel luminesceeruva materjaliga kaetud plaadiga, mida nimetatakse stsintillandiks (Brooker *et al.* 1978). Radioaktiivse antikeha hulk on pöördvõrdeline rakus oleva cAMP kontsentratsiooniga. Ka radioimmuunanalüüs on laia määramisalaga ning tundlik – pikomolaarsel tasemel (Harper *et al.* 1974). Kuna kõik eelnevad meetodid on destruktiivsed, ehk rakud on analüüsimiseks vaja lüüesida, siis ei ole samu rakke võimalik edasisteks analüüsideks kasutada. Sellest tulenevalt pole võimalik mõõta cAMP kontsentratsiooni muutusi ajas.

cAMP kontsentratsiooni saab tuvastada tsüklilise nukleotiidi seostumise kaudu cAMP-i poolt mõjutatavatele efektorvalkudele. Näiteks mõjutab tsüklilise nukleotiidi kontsentratsioon PKA-le seostumise kaudu kindla reportergeeni ekspressiooni. Geenis peab olema cAMP vastuselement (CRE, *cAMP responsive element*) (Nayloret *et al.* 1999). Vastav reportergeen reguleerib kindla ensüümi või fluorestseeruva/bioluminesceeruva valguga tootmist, mille poolt tekitatud signaali on võimalik mõõta. Meetod on seda tundlikum, mida kergemini on eristatav reportervalk teistest rakus olevatest ühenditest (Hill *et al.* 2001).

Fluorestsentspolarisatsioon (FP) tehnoloogia rakendamine cAMP katsetes põhineb fluorestsentsmärgistatud cAMP-i pöörlemise vähenemisel cAMP-vastase antikehaga seostumisel. Kui ergastada polariseeritud valgusega, siis märgistatud tsüklilise nukleotiidi emiteeritav valgus depolariseerub võrreldes ergastusvalgusest, mis on tingitud ergastuse ja kiirgamise vahelisel ajal toimuvast molekuli pöörlemisest. Märgistatud cAMP-i on seostumisel antikehale ergastamise ja

emissiooni vaheline rotatsioon väheneb, mistõttu väheneb ka depolarisatsioon. Antikehale seostunud fluorestsentsmärgisega cAMP-i puhul detekteeritakse kõrgemad polarisatsiooni näidud kui vaba märgistatud cAMP-i. Rakust pärineva cAMP-i juuresolekul saadakse madalamad polarisatsiooni väärtused, kuna konkureerivad sidumisele antikehadele (Williams, 2004).

Eelnevates meetodites cAMP-i kontsentratsiooni muutust reaajas jälgida ei saa, kuid saab mitmeid katseid tehes ajast sõltuvuse. Viimane ei ole väga täpne, kuna erinevates süvendites või rakkudes võib olla erinev cAMP-i baastase. Lisaks võivad kerkida ohud radioaktiivsete ainete töötlamisel, mis tingib eriliste ettevaatusabinõude kasutamise vajaduse. Enamike meetodite puhul tuleb cAMP-i kontsentratsiooni määramiseks rakudlüüsida, mis ei ole looduslähedane süsteem. Biosensorite areng on võimaldanud liikuda cAMP ruumilise ja ajalise lahutusega uuringutele rakutasandil (Willoughby *et al.* 2008).

Biosensorid on molekulid või rakud, mis annavad informatsiooni analüüdi kohta või jälgivad protsesse elus organismis või nende keskkonnas. Sensoreid cAMP detekteerimiseks on eelnevalt geneetiliselt disainitud ja vastavalt analüüdile spetsiifiliseks tehtud (Okumoto *et al.* 2012). Paljud biosensorid võimaldavad koguda paremat ajalist ja ruumilist informatsiooni cAMP-i dünaamika kohta raku tasandil (Willoughby *et al.* 2008).

Fluorestsentsil põhinevad biosensorid

Resonantsenergia ülekanne (RET, *resonance energy transfer*) kirjeldati esimest korda 1940. aastal Theodor Försteri poolt (Giraldo, 2011). Nähtus põhineb doonormolekuli ergastatud olekus mitte kiirgusliku energia ülekandel aktseptor molekulile. RET-l põhineva analüüsimeetodi efektiivsus sõltub oluliselt doonori ja aktseptori vahelisest kaugusest, milleks on optimaalselt 10-100 ongströmi. Kuna doonori ja aktseptori vaheline distant on korrelatsioonis enamike bioloogiliste interaktsioonidega, siis on antud meetod väga sobilik makromolekulaarsete interaktsioonide uurimiseks. RET-i näideteks on Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET) ja bioluminestsents energia ülekanne (BRET) (Joly *et al.* 2001).

BRET põhineb bioluminestsentsi doonori, nt. lutsiferaasi, ning fluorestseeruvate omadustega vastuvõtja molekuli vahelisel resonants energia ülekandel. Doonori luminestsents leiab aset ensümaatilise reaktsiooni tulemusena. BRET toimub kui doonor on aktseptoriga parajal kaugusel ligikaudu 50 angstromining kui doonori luminestsents kiirgusspekter kattub

sobivaltfluorofoori ergastusspektriga(Joly *et al.* 2001)..BRET tehnoloogia annab hea signaalmüra suhte ning sobib hästi kõrge läbilaskevõimega populatsioonianalüüsiks (Jiang *et al.* 2007).

FRET on nähtus, mis kirjeldab energia ülekannet kahe fluorofoori vahel. Sarnaselt BRET-le kandub ergastatud olekus doonor-fluorofoori energia mittekiirguslikult üle aktseptorile, kui fluorestseeruvad molekulid on teineteisele piisavalt lähedal (10-100 nm). Näitekskuifluorofooride omavaheline orientatsioon ja kaugus suurenevad, siis FRET efektiivsus väheneb. Sellist iseärasust saabki ära kasutada biosensorites, kus analüüdi seostumine FRET paari vahelisse alasse tingib sensorvalgu konformatsioonimuutuse, mille tagajätjel muutub FRET signaal.Enamus cAMP biosensorid põhinevad FRET-l (Willoughby *et al.* 2008).

FRET-paari efektiivsust iseloomustab eelkõige Försteri kaugus R_0 -i väärtus ehk kaugus, kus energia ülekande efektiivsus on 50%. R_0 sõltub oluliselt doonori emissioon spektri ja aktseptori ergastusspektri kattumisest. Eeldatakse, et mida suurem on Försteri distant, seda suuremat dünaamilist ala võimaldab see sensor.

Fluorofooride ja nendest moodustavate FRET-paaride efektiivsust iseloomustatakse mitmete faktoritega. Fluorofoori kvantsaagis näitab, kui intensiivset ergastuskiirgust on vaja, et saavutada piisav emissioon. Fluorofoori neelduvuskoeffitsient näitab, kui suur kogus valgust absorbeerub teatud lainepikkusel. Eelneva kahe omaduse korrutisel saadakse fluorestsentsvalgu eredusväärtus. Fluorofooride stabiilsust pideva, intensiivse ergastusvalguse ehk fotopleegituse suhtes väljendab fotostabiilsus (Lakowicz, 2007).Lisaks on oluline, et fluorofoori ei mõjutaks konkreetse keskkonna pH ning iooniline koostis, samas ei reageeriks fluorofoor teiste molekulidega või mõjutaks nende paiknemist. FRET-paaride puhul on lisaks oluline fluorofooride omavaheline kaugus, dipoolide orientatsioon ning spektrite kattuvus. Aktseptorfluorofoor on eelistavalt suure Stokes'i nihkega, et eristada doonori ja aktseptori kiirguseid, ning selle ergastusspekter kattub piisavas ulatuses doonori emissioonspektriga. Bioloogilisest aspektist peab sensor olema inertne vastavas keskkonnas, fluorestseeruvad molekulid ei tohi segada raku funktsioone ja mõjutada märgistatud valgus asukohta. Seetõttu biosensoris kasutatavad fluorofoorid peaksid olema minimaalse suurusega ning nende kalduvus moodustada dimeere peaks olema tõrjutud. (Van der Krogt *et al.* 2008)

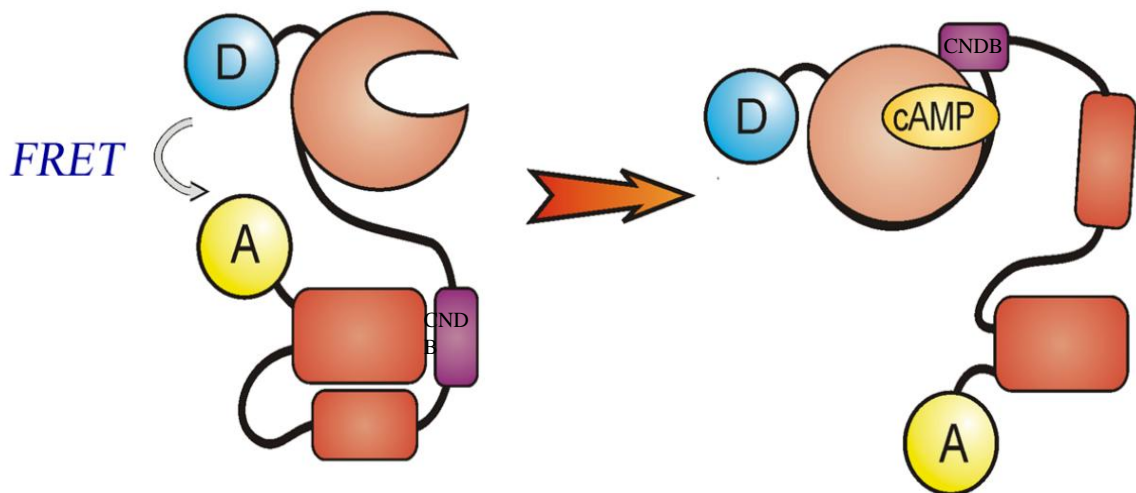
FRET-l põhinevad cAMP biosensorid

Esimene cAMP uurimiseks välja töötatud FRET biosensor põhines PKA dissotsiatsioonil (Adams *et al.* 1991). Sensor koosnes PKA reguleerijatest ja katalüütilistest alaühikutest, mis olid keemiliselt märgistatud vastavalt rodamiini ja fluoretsiiniga. cAMP-i seostumisest tingitud dissotsiatsiooni tagajärjel fluorofooride vaheline kaugus suureneb sedavõrd, et FRET väheneb. Sensor andis esimesed visuaalsed tõendid cAMP ruumilise paigutuse kohta rakus (Adams *et al.* 1991).

Mõningate puuduste esinedes, näiteks PKA alaühikud võivad rakus assotsieeruda vabade alaühikutega, arendati välja uuemad sensorid. Nendeks onainuüksi cAMP-i siduvatel domeenidel, näiteks Epac-valgust pärinevad, põhinevad biosensorid, millel puudub katalüütiline aktiivsus ja koöperatiivne sidumine (sensori signaali muutumiseks piisab vaid ühe cAMP molekuli seostumisest, erinevalt nt. PKA-l põhinevatest sensoritest, kus on vajalik nelja cAMP molekuli seostumine). Kuna keemiliselt märgistatud valgud olid ebastabiilsed ning neid oli keeruline toota, asendati fluoretsiin ja rodamiingeneetiliselt kodeeritavate tsüano (CFP) ja kollase (YFP) fluorestsentsvalkudega (Nikolaev *et al.* 2006).

Oluline on ka biosensori kineetika. Sensori aktivatsioonikiirus on seotud cAMP-i ajalise muutuse jälgimisega. PKA põhisel cAMP sensoril on aktivatsioonikiirus seotud nelja tsüklilise nukleotiidi seostumisel sensorile, millele järgneb alaühikute dissotsiatsioon. Seega antud sensoril aktivatsioonikiirus on limiteeritud sensoril enda kineetikaga. Epac-põhise sensoril puhul on vaja vaid ühe analüüdi molekuli seostumist sensorile ning detektsiooni kiirus on seega limiteeritud cAMP produktsiooniga rakus. Seetõttu on monomolekulaarsete sensoritega võimalik saada kõrgem ajaline lahutus (Nikolaev *et al.* 2004).

Käesolevas töös käsitletakse $^{T}Epac^{VV}$ biosensorit, mis koosneb Epac1-valgule seotud mTurquoise ja Venus fluorofooride tandemist (Klarenbeek *et al.* 2011), (Joonis 1). cAMP



Joonis 1: Epac-valgul põhineva cAMP biosensori tööpõhimõte. Sensor koosneb kahest fluorestseeruvast valgust doonorist (D) ja aktseptorist (A) ning nende vahel paiknevast tsükliilist nukleotiidi siduvast domeenist (CNDB). cAMP seostumine domeenile indutseerib valgukonformatsiooni muutuse, mistõttu suureneb doonori ja aktseptori vaheline kaugus ning FRET väheneb (Klarenbeek *et al.* 2011).

sidumine sensorile indutseerib valgukonformatsiooni muutuse, mille tagajärjel suureneb mTurquoise (doonor, D) ja Venus-Venus (dVenus) (aktseptor, A) vaheline kaugus ja muutub fluorofooride orientatsioon, mille tulemusena FRET väheneb. Biosensor on tsütosoolis ühtlaselt jaotunud ning on katalüütiliselt inaktiivne. Fluorestsentsvalkudel põhinevate sensorite eelisteks on cAMP-i määramisel nende geneetiline kodeeritus, erinevates rakutüüpides ekspresseerimisevõimalikkus ja mikrosüstimise vajaduse puudumine.

$^{T}Epac^{VV}$ biosensor on suure kvantsaagisega ning fotostabiilsusega (Klarenbeek *et al.* 2011). Hiljuti on välja töötatud veelgi paremad fluorofoorid, nagu Clover ja mRuby2, mis omavad suuremat kvantsaagist, neelduvuskoefitsienti ja paremat fotokonversiooni, muutes sellisel FRET paaril baseeruvad biosensorid väga tundlikuks (Lam *et al.* 2012).

Biosensorites kasutatavate fluorestsentsvalkude areng

Tänapäevani ei ole valmistatud ühtegi ideaalset FRET põhist sensorit, kuid sinna suunas liigutakse.

Esimese generatsiooni FRET paar (CFP-YFP) on olnud väga populaarne ja paljud laborid kasutavad seda väga erinevates rakendustes. Kuid antud fluorofoorid ei ole perfektsed ning leiab kohti, mida võib saada paremaks muuta. YFP puuduseks on pH'st, vähesel määral UV-valgusest ja kloriid-ioonidest sõltuvus, mis võib emissiooni mõjutada. CFP puuduseks on UV-valgusest sõltuvus (Van der Krogt *et al.* 2008).

YFP puuduste parandamisel vahetati kollane fluorestsentsvalk kahe järjestikuse Venus valguga. Venus fluorofoori pKa (6,0) on tunduvalt madalam YFP (7,0) omast, mistõttu on see vähem pH tundlik (Nagai *et al.* 2002). Venus valk on UV-kiirguse suhtes vähetundlik. Kahe fluorofoori tandemi rakendamine suurendas FRET-i efektiivsust ka cAMP biosensori arendamisel, kuna aktseptori neeldumiskoeffitsient on suurem (Van der Krogt *et al.* 2008). Üks Venusest on tsirkulaarselt permuteeritud (^{cp173}Venus), mis tähendab aminohapete (AH) järjestuse vahetust, parandades FRET-i ulatust tänu aktseptori dipoolide optimaalsemale ruumilisele orientatsioonile. Doonori ja aktseptori vahelist kaugust üritati minimeerida, kuid seda ei saanud väga hästi teha fluorofooride arvelt, kuna fluorestsentsvalkude efektiivsus võis väheneda. (Van der Krogt *et al.* 2008)

Eelneva sensori optimeerimiseks vahetati CFP mTurquoise vastu, mis tõstis oluliselt FRET efektiivsust (Klarenbeek *et al.* 2011). mTurquoise on väga ere fluorofoor, mis sobib hästi FRET paari doonoriks. mTurquoise kvantsaagis on 0,84 ja neelduvuskoeffitsient $30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mis teeb eredusväärtuseks (kvantsaagise ja neeldumiskoeffitsendi korrutise väärtus) 25 (Goedhart *et al.* 2010). CFP vastavad näitajad on 0,4 ja $32,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ning 13 (Lam *et al.* 2012). mTurquoise enam kui kahekordistunud kvantsaagis annab hea signaal-müra suhte ning võimaldab minimeerida ergastusest tulenevaid kahjustusi. Täheledatai doonori efektiivsuse paranemist, mida põhiliselt iseloomustavad kaks faktorit. Esiteks, mTurquoise on fotostabiilsem fluorofoor kui CFP, kuna visuaalsel dektekterimisel on värvikadu oluliselt väiksem. Teiseks, mTurquoise suurem kvantsaagis tagab suurema osa neelduvast energiast eraldumise fluorestsentsina või mittekiirgusliku ülekandena aktseptorile. Sensor ^{TEpac}^{VV} sobib nii fluorestsentsintensiivsusel põhinevatesse katsetesse kui ka fluorestsents eluea mõõtmiste jaoks (Klarenbeek *et al.* 2011).

Eraldiseiva uurimisgrupi poolt tehtud töös püüti CFP-YFP FRET-paari puuduste likvideerimiseks kasutada rohelist ja punast fluorofoori (Lam *et al.* 2012). Varasemalt kirjeldatud fluorofoorid ei olnud piisavalt heade omadustega, mistõttu töötasid välja uue rohelise ja punase fluorofoori, vastavalt Clover ja mRuby2 (Lam *et al.* 2012). Sensorite analüüsil ajenduti FRET efektiivsusest. Täheldati, et uute fluorestsentsvalkude arendamisel tuleb arvesse võtta doonori ja aktseptori emissioonispektrite võimalikult minimaalset kattuvust. Lisaks peab nii doonori kui ka aktseptori kvantsaagis olema võimalikult suur, et R_0 väärtustparandada (Lam *et al.* 2012).

Doonori ereduse määrab neelduvuskoeffitsendi ja kvantsaagise korrutis. Kuna GFP-i emissiooni spekter kattub oluliselt RFP-i neeldumisspektiga, üritati parandada kvantsaagist just doonorfluorofooril. Fluorofoorioptimeerimisel eeldati, et vesiniksidemete vähendamine aitab tõsta kvantsaagist, kuna selle tagajärjel doonori ergastatud olekus toimuks vähem mittekiirguslikku relaksatsiooni. GFP-le tehti vastavad mutatsioonid, aminohappeid vahetades, ning saadi fluorofoor, mida kutsutakse Cloveriks. Uue doonori kvantsaagiseks saadi 0,76 ning neelduvuskoeffitsendiks $111 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mis teeb Cloverist ühe eredaima rohelise fluorofoori, eredusväärtusega 84 (Lam *et al.* 2012). mTurquoise kvantsaagis on küll suurem, mis tagab neelduvast energiast eraldumise fluorestsentsina, kuid neelduvuskoeffitsent palju madalam. GFP ja CFP parameetrite väärtused jäävad samuti Colveri näitajatele alla. Lisaks on Clover piisavalt fotostabiilne ning võimalikult minimaalse suurusega, 228 AH (GFP 238 AH).

Ideaalne FRET partner Cloveri jaoks oleks suure kvantsaagisega, neelduvuskoeffitsendiga ning kõrge fotostabiilsusega. Uurimisrühm analüüsis sobivaid kaaslasi doonorile ning leidis aktseptori mRuby, millel olid esimesed kaks parameetrit sobivad Cloverile, kuid fotostabiilsusega oli probleeme. Aktseptori optimeerimiseks tehti valgu järjestuses neli mutatsiooni, mis on seotud fotostabiilsusega ning uus produkt sai nime mRuby2. Uue aktseptori kvantsaagiseks saadi 0,38 ja neelduvuskoeffitsendiks $113 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ning eredusväärtuseks 43 (Lam *et al.* 2012). mRuby vastavad väärtused on 0,35 ja $112 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ning 39.

Uus FRET-paar Clover-mRuby2 omab suurt doonori kvantsaagist, aktseptori neelduvuskoeffitsenti ning suurimat teadaolevat R_0 väärtust, milleks on 6,3 nm. Sobib hästi nii fluorestsenti intensiivsuse muutuste kui ka fluorestsents eluea muutustemääramiseks (Lam *et al.* 2012). Antud FRET-paar tundub olevat väga sobilik cAMP biosensori konstrueerimiseks. Clover-mRuby2 paari testiti neljal erineval FRET sensoril, millega saab määrata kas kinaaside aktiivsusi või membraani pinget. Sensoritel Camui α , AKAR2, VSFP2.3 ja Raichu-RhoA vahetati eelnevad fluorestseeruvad valgud Cloveri ja mRuby2 vastu ning nende FRET efektiivsused

paranesid märgatavalt eelmise sensoriga võrreldes vastavalt 62%, 117%, 43% ja 160% (Lam *et al.* 2012). Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida uus Epac valgul põhinev cAMP biosensor kasutades Clover-mRuby2 FRET paari.

EKSPERIMENTAALOSA

Aparatuur ja materjalid

Polümeraasahelreaktsioonid (PCR) teostati Eppendorf Mastercycler Gradient masinaga. DNA plasmide puhastati E.coli DH5- α rakkudest vastavalt *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) komplekti ning tootja protokollil alusel. DNA kontsentratsioonid määrati Thermo Scientific NanoDrop 1000 spektromeetriga. Sekveneerimised teostati TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudis.

DNA eraldati agaros-geelelektroforeesiga meetodil ja geelide pildistamiseks kasutati Canon kaamerat, UV-valguse saamiseks Cleaver Scientific UV transilluminatorit. Geelelektroforeesil kasutati Bio-Rad horisontaal vesivanni ning vooluallikaks LKB Bromma 2301 MacroDrive1'i.

Bakterite kultuure inkubeeriti FTC 90E Refrigerated Incubator-s.

Bakterisöötme SOC (*Super Optimal Broth*) valmistamiseks kasutati : Trüptooni (Lab M), pärmiekstrakti (Lab M), KCl (Reahim), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Acros), MgSO_4 (Reahim) ja glükoosi (Kebo).

Kasutatud puhvrid: TAE puhver : 0,04M Tris (AppliChem), 0,04 M äädikhape (Naxo) ning 0,001 M EDTA (AppliChem);

puhver Orange: (0,05 M Tris-HCl, 0,01 M MgCl_2 , 0,1 M NaCl, 0,1 g/l BSA);

puhver Tango1X: (0,033 M Tris-äädikhape, 0,01 M magneesiumatsetaat, 0,066 M kaaliumatsetaat, 0,1 g/l BSA);

puhver Tango2X: (0,066 M Tris-äädikhape, 0,02 M magneesiumatsetaat, 0,132 M kaaliumatsetaat, 0,2 g/l BSA);

puhver Ligase: (0,4 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl_2 , 0,1 M DTT, 0,005 M ATP);

puhver Dream Taq: (0,2 M Tris-HCl, 0,5 M KCl).

Kõik ensüümid ja nende vastavad puhvrid telliti Thermo Scientific-st ning meie poolt disainitud praimerid Microsynth-st.

Kasutatud praimerid:

Ruby forward (5'-TTTTCGCGATGCCATGGTGCGGGGTTCTCATC-3')

Clover reverse (3'-TAAGATATCGGCGGCGGTTCACGAACTCC-5')

T7 forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')

BGH reverse (3'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-5')

DNA fragmentide paljundamine

Oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifiline mutagenees on metoodika, kus asendatakse või lisatakse kindel geenijärjestus teise eelnevalt kindlaksmääratud või disainitud järjestusega. Selles töös disainiti praimerid Clover reverse ja Ruby forward. Esimesega luuakse pcDNA3-Clover vektorisse sobiv restriksioonisaht EcoRV ning teisega pcDNA3-mRuby2 vektorisse sobiv restriksioonisaht NruI. Metoodika läbiviimiseks kasutatakse PCR reaktsiooni. PCR masinas tuli programmeerida vastavalt paljundatava fragmendi suuruse ja praimeritele sobiva töötemperatuuri järgi. Esimeses etapis toimus 95°C juures minuti jooksul DNA täielikdenatureerimine. Denatureerimise etapis toimus 95°C juures 30 sekundi jooksul DNA kaksikheeliksi lagunemine kaheks üksikahelaks. Järgmises etapis seostuvad 30 sekundi jooksul praimerid DNA üksikahelatele. Selle etapi jaoks valiti sobilik töötemperatuur vastavalt praimeritele. Nii forward kui reverse praimeritele leiti sobiv seostumistemperatuur (*annealing temperature*) ($T_m - 5$) ning madalamat väärtust kasutati PCR-reaktsioonil. Praimeritele Clover reverse ja T7 forward oli optimaalne 46°C ning Ruby forward ja BGH reverse 45°C. DNA komplementaarse ahela süntees toimus 72°C juures 60 sekundit. Eelnevalt kirjeldatud kolme etappi (denatureerimine, seostumine ja komplementaarahela süntees) teostati 32 korda, et amplifitseerida ehk kordistada piisav arv DNA molekule. Pärast 32 tsüklit kuumutati 72°C juures 10 minutit, et pooleliolevad DNA sünteesid saaks lõpuni teostatud.

Clover-Epac-mRuby2 biosensori loomiseks lähtuti T_{Epac}^{VV} (Klarenbeek *et al.* 2011) vektorist, milles asendati mTurquoise Cloveriga ning dVenus mRuby2-ga. pcDNA3-Clover (Addgene) vektorist Cloveri eraldamiseks ja kloonimiseks kasutati oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifilist mutageneesi. PCR-reaktsioon viidi läbi primeritega Clover reverse ja T7 forward, Taq DNA Polymerase ensüümiga, Dream Taq puhvris koos 0.2 mM dNTP-ga ja mQ H₂O. Sarnase PCR reaktsiooni abil eraldati ka mRuby2 pcDNA3-mRuby2 (Addgene) vektorist,

kasutades primereid BGH reverse ja Ruby forward. Taq Polymerase vajab magneesium ioone, mis on kofaktoriks ensüümile ning eelnevalt mainitud puhver sisaldab neid.

Geelelektroforees

Sobiva molekulmassiga fragmentide tuvastamiseks ja eraldamiseks kasutati agarose-geelelektroforeesi. Geeli valmistamiseks kasutati agarosi (Naxo) ja TAE puhvrit (pH 8,3). Agarosi kontsentratsioon geelis oli väiksemate lahutamisel 1% ja suuremate fragmentide puhul 0,7% ning pingeid reguleeriti vooluallikal vastavalt väiksemate jaoks 70-80V ja suurematele 40-50V. Elektroforeesi vann oli täidetud TAE puhvriga. Geelist puhastati DNA vektorid kasutades *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* komplekti (Thermo Scientific) tootja protokollil alusel.

Geelist puhastamiseks kaaluti geelitükid ning lahustati kuumutades (55°C juures) seostumispuhvril. Seejärel lisati lahusele silikageeli, millele järgnes tsentrifuugimine. Järgmises etapis, eraldati sademe kohalt lahus ning sadet pesti 95% etanooliga ja tsentrifuugiti. Etappi korrati kolm korda. Viimase etapina lisati sademele mQ kvaliteediga vett, kuumutati ja tsentrifuugiti. Elueeritud DNA-d sisaldav vesilahuse eraldati sademelt. Puhastatud DNA fragmente hoiustati -20°C juures või teostati koheselt ligeerimine.

Restriksioon ja ligeerimine

PCR reaktsioonil loodud uute restriksiooni saitide abil kloneeriti Cloveri geenijärjestus pcDNA3-H74 plasmiidis mTyrquoise geenijärjestuse asemele. Selleks kasutati HindIII ja EcoRV restriktase puhvril Tango2X. DNA inkubeeriti ensüümidega 37°C juures 60 minutit ning seejärel inaktiveeriti ensüümid 65°C juures 20 minuti jooksul.

Analoogselt lõigati ka mRuby2 ehk doonor välja NruI ja XbaI ensüümidega Orangepuhvril. Vastuvõtja vektorist lõigati dVenus välja mitmes etapis. Esimeses etapis kasutati NheI ensüümi Tango1X puhvril ning inaktiveeriti. Seejärel tõmbistati DNA otsad (lisades dNTP segu ja Klenow fragment polümeraasi kasvatati juurde komplementaarse ahela lõpuosa puuduvad nukleotiidid). Selleks kasutati 1 µl (10 u/µl) Klenow fragmenti ja 0.2 mM dNTP-i. Lahust inkubeeriti 37°C juures 15 minutit ning inaktiveeriti 75°C juures 10 minutit. Viimase etapina lõigati DNA fragmenti XbaI ensüümiga Tango2X puhvril ning inaktiveeriti.

Aluseline fosfataas (SAP, *Shrimp alkaline phosphatase*) on ensüüm, mis defosforüleerib DNA otsad, seejärel ei saa DNA fragment iseendaga liigeruda. Spetsiifilisuse tagamiseks ligeerimisel lisati vastuvõtja vektorile 1 µl (1 u/µl) SAP-i (Fermentas) ning inkubeeriti 37°C juures 3 kuni 4 tundi. Doonori ja vastuvõtja vektori ligeerimiseks lisati 2 µl Ligase Buffer, 2 µl PEG4000 (Fermentas) ja 1 µl (5 u/µl) Ligase ensüümi ning inkubeeriti 16°C juures üleöö.

Rakkude transformeerimine

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *E. coli* RbCl₂ kompetentseid DH5α rakke (Valmistatud TÜ Tehnoloogia Instituudis), Luria-Bertani (LB) puhvrit (AppliChem), agarit (Invitrogen), ampitsiliini (Invitrogen) ning SOC-söödet.

Kompetentseid rakke säilitati -80°C juures ning katsete tegemiseks sulatati jääl. Ligeerimisegu 20 µl ning *E. coli* RbCl₂ kompetentseid DH5α rakke 50 µl segati omavahel ning inkubeeriti 15 minutit jääl. Inkubeerimisele järgnes kuumašokk vesivannis 42°C juures 45 sekundit ning seejärel jahutamine 2 minutit jääl. Reaktsioonisegule lisati 500 µl SOC söödet ja inkubeeriti 37°C juures 3 kuni 4 tundi koos segamisega (240 rpm). Saadud segu kanti 50 mg/ml ampitsiliini sisaldavale 2% agar-LB plaadile ning inkubeeriti 37°C juures üleöö.

Ligeerimise ja transformeerimise õnnestumist kontrolliti Colony-PCR meetodiga. Transformeerimisegu plaaditi 2% Agar-LB söötmeplaadile ning 12 tundi hiljem valiti kontrollimiseks plaadilt 6-10 rakukolooniat. Neid puudutati pipetiotsikuga ning asetati PCR-tuubidesse. Colony-PCR esimeses etapis kuumutatakse rakke 95°C juures 3 minutit, kus rakud lüüsitakse. Seejärel lisatakse Taq DNA polümeraas ning denatureeritakse DNA kaksikheeliks kaheks üksikahelaks 95°C juures 30 sekundit. Praimerite seostumise etap toimus 43°C (praimeritele BGH reverse ja T7 forward sobilik töötemperatuur) juures 30 sekundit. DNA sünteesi etap toimus 72°C juures 5 minuti jooksul, kus sünteesiti üksikahelatele (koos praimeritega) komplementaarne ahel. Eelnevat kolme etappi teostati 30 korda, et amplifitseerida piisav arv DNA molekule. Pärast 30 tsüklit kuumutati 72°C juures 10 minutit, et pooleliolevad DNA sünteesid saaks lõpuni teostatud.

Clover-Epac-dVenus fragmendi paljundamiseks viidi läbi Colony-PCR praimeritega T7 forward ja BGH reverse, Taq DNA Polymerase ensüümiga, Dream Taq puhvris koos 0,2 mM dNTP-ga ning mQ H₂O. Kui kontroll osutus edukaks, paljundati vastav rakukoloonia 50 mg/ml ampitsiliini sisaldusega 3 ml LB-puhvris ning uus plasmiid puhastati *E. Coli* DH5-α

rakkudest. Puhastamiseks tsentrifuugiti ning resuspendeeriti rakud, nende etappidega eemaldati söötmelahus. Seejärel lüüsi rakud ning neutraliseeriti, millele järgnes tsentrifuugimine. DNA-d sisaldav supernatant eraldati ning kanti polaarsete eralduskolonnidele. Järgmises etapis, pesti kolonni 70% etanooliga ja tsentrifuugiti. Etappi korrati kaks korda. Viimase etapina elueeriti DNA kasutades mQ kvaliteediga vett. Kolonn tsentrifuugiti ning saadud lahuses määrati DNA kontsentratsioon. Plasmiide hoiustati temperatuuril -20°C.

TULEMUSED JA ARUTELU

Töö eesmärgiks oli Clover-Epac-mRuby2 biosensori konstrukti loomine. Selleks valiti strateegia, kus H74 vektorist vahetati välja nii doonor kui ka aktseptor fluorofoorid, vastavalt mTyrquoise Cloveri ning dVenuse mRuby2 vastu. Esimese etapina toimus Clover ja mRuby2 vektorite soetamine, paljundamine ja puhastamine. Veendumaks, et lõpp-produkt on õige aluspaaride järjestusega, teostati plasmiidse DNA sekveneerimine. Puhastamisel saadi suure saagisega õiged produktid, Cloveri kontsentratsioon 775 ng/μl (200 μl) ning mRuby2 kontsentratsioon 493 ng/μl (200 μl).

Kloonimise strateegia ja praimerite disain

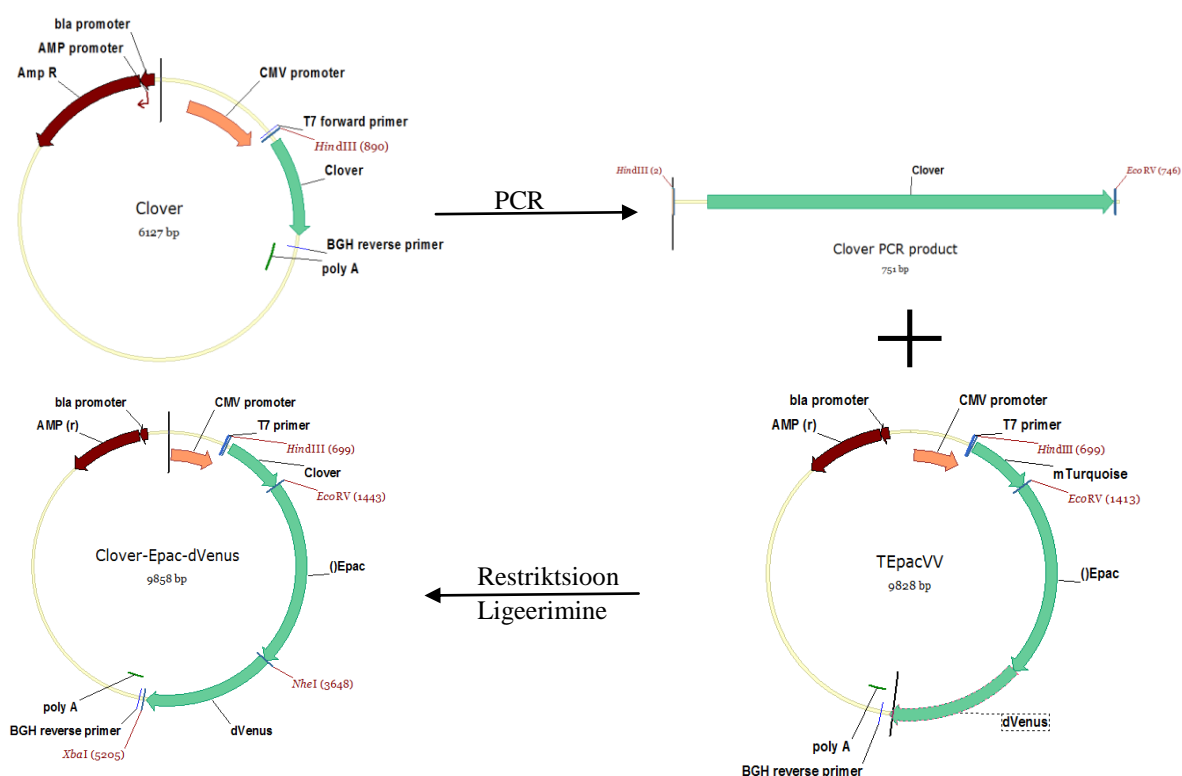
Cloveri geenijärjestuse väljalõikamiseks puudusid sobivad ensüümid, millel oleks sobivas kohas vaid üks restriksioonisaite. Cloveri paljundamiseks ja väljalõikamiseks disainisime praimerid Clover reverse, mis loob EcoRV restriksioonisaite Clover geeni lõppu. Enne geeni kasutati vektori HindIII ensüümi. mRuby2 jaoks disainisime praimerid Ruby forward, mis loob NruI restriksioonisaite eespool geenijärjestust. Pärast mRuby2 geenijärjestust kasutati XbaI ensüümi.

Praimerite disainimiseks arvestati kolme põhilist parameetrit. Esiteks, tsütosiini (C) ja guanosiini (G) aluste osakaal oligonukleotiidis peaks jääma vahemikku 40-60%. G ja C vahel on kolm vesiniksidet, mistõttu tõstavad need praimerite sulamistemperatuuri (T_m). T_m on temperatuur, millel pooled praimerid on seostunud komplementaarse järjestusega. Optimaalseks T_m -i vahemikuks on 42-65°C. Forward ja reverse primerite T_m peaks olema võimalikult lähedane. Lisaks peab arvesse võtma praimerit moodustavate nukleotiidide arvu, milleks on optimaalselt 18-30 aluspaari. Selles vahemikus on praimer piisava pikkusega, et sidumine oleks spetsiifiline vastavalt komplementaarsuse printsiibile (Dieffenbach *et al.* 1993). Kui praimer on liiga pikk, siis selle töötemperatuur on liiga kõrge, ja kui praimer on liiga lühike, siis ei ole praimer enam piisavalt spetsiifiline. Ruby forwardi disainimise puhul võeti omakorda arvesse, et enne ATG-d (Adenosiin-Tümiin-Guanosiin) oleks kasutusel Kozak järjestuse võimalikult konserveeritud nukleotiidide järjestus, mis tagab rakus RNA efektiivsema translatsiooni valgu biosünteesil (Lehninger, 2005).

Clover reverse praimer G ja C protsentuaalseks sisalduseks oli 57%, T_m -ks 60°C ning pikkuseks 28 aluspaari. Ruby forward praimer vastavateks parameetriteks on 56%, 58°C ja 32 aluspaari.

Doonori mTurquoise vahetamine Cloveri vastu

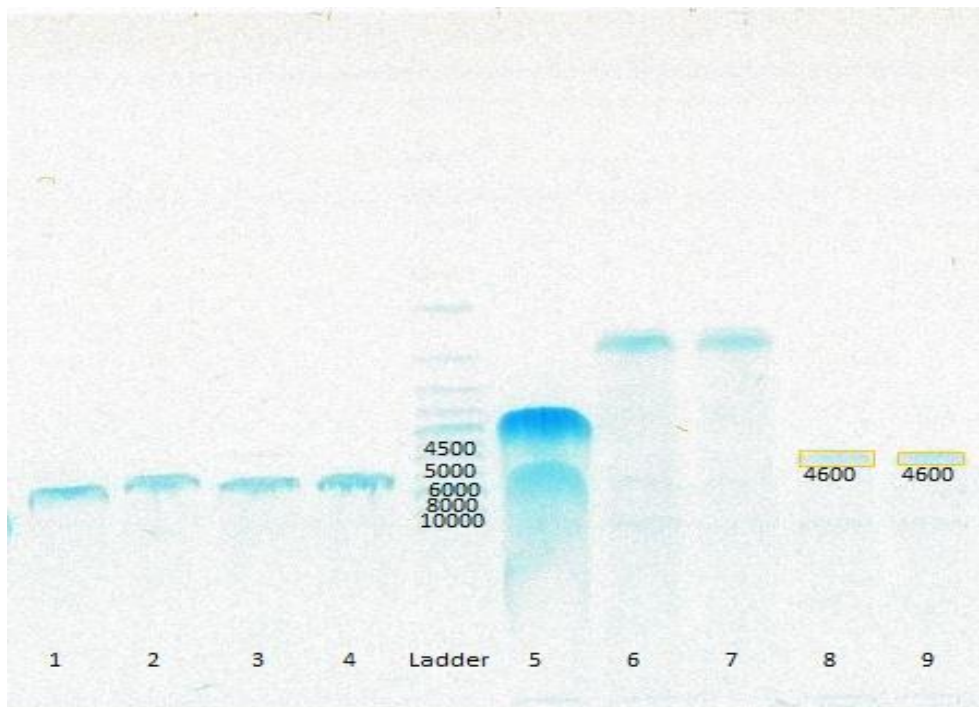
Cloveri geenijärjestuse kloonimiseks TEpac^{VV} vektorisse toimus mitmes etapis: oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifiline mutagenees PCR-reaktsiooni abil, restriksioon ja ligeerimine (Joonis 2).



Joonis 2: Cloveri H74 vektorisse kloonimise skeem. Cloverile loodi oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifilise mutageneesiga (PCR reaktsiooni abil) EcoRV restriksioonisaht. Cloveri geenijärjestus PCR-produktist kui ka mTyruoise järjestus H74 vektorist eraldati HindIII ja EcoRV ensüümidega ning teostati ligeerimine.

Colver vektori jaoks disainitud praimeriga Clover reverse teostati oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifiline mutagenees, mis loob ensüümi EcoRV jaoks restriksioonisahti. Katsete tulemusena selgus, et optimaalne töötemperatuur antud PCR masinal Clover reverse ja T7

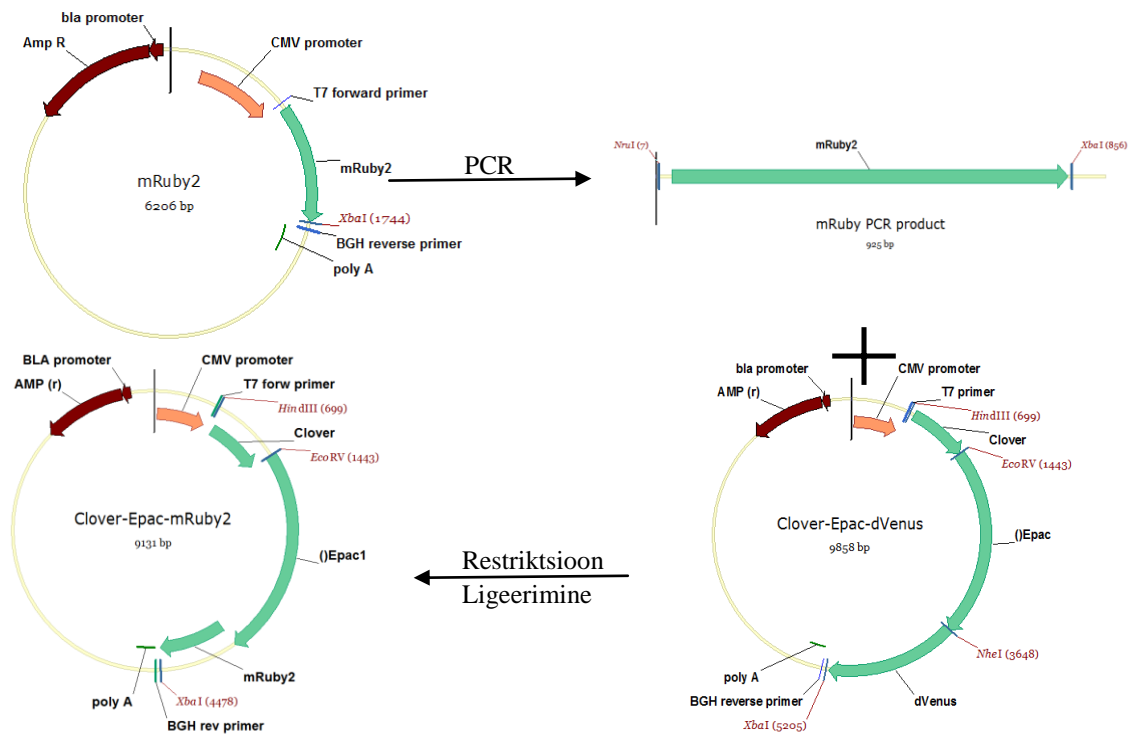
forward praimerite jaoks on 46°C. Järgmisena eraldati HindIII ja EcoRV ensüümidega T_{Epac}^{VV} vektorist mTyrquoise ning PCR produktist Clover järjestused. Vastuvõtja vektorile ehk T_{Epac}^{VV} (ilma mTyrquoise fragmendita) lisati SAP-i ning inkubeeriti. Restriktsioonidele järgnes geelelektroforeesi meetodil DNA fragmentide lahutamine ning puhastamine geelist. Saadud fragmendid ligeeriti ning DNA-ga transformeeriti E. Coli DH5- α kompetent rakke. Rakkude paljundamiseks inkubeeriti neid agar-LB plaadil 16 tundi. Ligeerimise ja transformeerimise kontrolliks teostati juhuslikult valitud rakukolooniatele Colony-PCR. Kvantitatiivne kontroll osutus edukaks, kuna geelis tuvastati oodatava suurusega amplifitseeritud DNA fragmendid (4600 aluspaari; joonis 3). Järgnevalt paljundati positiivsed rakukolooniad, rakud lüüsi ning puhastati plasmiidne DNA. 8. ja 9. süvendi rakukolooniate paljundamise tulemusena saadi vastavalt kontsentratsioonid 539 ng/ μ l ja 9. oma 356 ng/ μ l. Rekombinantse geenijärjestuse kontrollimise eesmärgil viidi produktid sekveneerimisele. Sekveneerimistulemuste analüüsil veenduti etapi edukusest, H74 plasmidi on kloonitud mTyrquoise asemele Clover (Joonis 2).



Joonis 3 : Geeli pilt Colony-PCR-st. Katsete kvantitatiivset õnnestumist on näha süvendites nr. 8 ja 9 ehk kollase märgitud on positiivsed rakukolooniad, mille plasmiid sisaldab Clover-Epac-dVenus geenijärjestust. Süvendites 1-7 on tuvastatavad mittespetsiifilised produktid, näiteks 5. süvendis olev produkt viitab vastuvõtja vektori iseeneslikule kleepumisele.

Aktseptori dVenuse vahetamine mRuby2 vastu

pcDNA3-mRuby2 jaoks disainitud praimeriga Ruby forward teostati oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifiline mutagenees, mis loob ensüümi NruI jaoks restriksioonisaidi. Optimaalne töötemperatuur BGH reverse ja Ruby forward praimerite jaoks on 45°C. Järgmiseks eraldati PCR-produktist mRuby2 NruI ja XbaI restriктаasidega, Clover-Epav-dVenus vektorist dVenus NheI ja XbaI ensüümidega.



Joonis 4: mRuby2 Clover-Epac vektorisse kloonimise skeem. mRuby2-le loodi oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifilise mutageneesiga (PCR reaktsiooni abil) NruI restriksioonisaht. mRuby2 järjestus eraldati PCR-produktist NruI ja XbaI ning dVenus eraldati Clover-Epac vektorist NheI ja XbaI restriктаasidega.

Viimast fragmenti tõmbistati (sünteesiti kleepuvates otstes puuduvad komplementaarsed nukleotiidid) lisades Klenow fragmenti ja dNTP-d. Vastuvõtja vektorile ehk Clover-Epac (ilma dVenus fragmendita) lisati SAP-i ning inkubeeriti (vältimaks konstrukti iseeneslikku ligeerumist ning suurendada sisse viidava fragmendi ligeerumise edukust). Restriksioonidele järgnes geelelektroforeesi meetodil DNA fragmentide lahutamine ning puhastamine geelist. Saadud fragmendid ligeeriti ning DNA-ga transformeeriti *E. Coli* DH5- α kompetent rakke. Rakkude paljundamiseks inkubeeriti neid agar-LB plaadil 16 tundi. Ligeerimise ja transformeerimise kvantitatiivseks kontrolliks teostati juhuslikult valitud rakukolooniatele Colony-PCR.

Colony-PCR fragmendidpeaksid tulema 3700 aluspaari, kuid enamus fragmente olid 2900-3300 aluspaari väärtuste juures, mis viitab vastuvõtja vektori iseenesliku kleepumisele. mRuby2 (~830 aluspaari) ei ole edukalt Clover-Epac (~2900 aluspaari) vektorisse kloonitud, vaid Clover-Epac fragment on iseendi DNA otstega kleepunud. Paljundati ja puhastati kõige lähedasem produkt esimesele väärtusele ning sellele teostati DNA sekveneerimine. Sekveneerimistulemuste analüüsimisel saadi viimasele hüpoteesile kinnitus. Vastuvõtja vektor Clover-Epac on iseeneslikult kleepunud. Katsete ebaõnnestumise põhjuseks võib olla SAP fosfataasi ebapiisav aktiivsus, ehk ensüüm ei ole antud kontsentratsiooni juures võimeline defosforüleerima vastuvõtja vektori DNA otsasid. Järgmistes katsetes varieeriti SAP kontsentratsiooni (1-2 u) ja inkubeerimise (3-5 tundi) aega, kuid korduskatsete Colony-PCR fragmendid viitasid iseeneslikule kleepumisele.

Veel üheks võimalikuks tõrkeks võib olla ebaõnnestunud NruI restriksioonisaadi loomine PCR reaktsioonis. PCR produkti restriksioonil on tulemuseks pea sama molekulmassiga DNA järjestus (1200 aluspaari), mis peale PCR produkti restriksiooni geelist puhastatakse (1180). Nii väikest erinevust ei ole geelelektroforeesil võimalik eristada ja seega võimalikku probleemi tuvastada. Siiski arvame, et taoline tõrge peaks olema välistatud, kuna sait-suunatud mutageneesiks vajaliku praimerid disainimisel arvestati kõiki vajalikke parameetreid ning usaldame Microsynthi ettevõttes sünteesitud oligonukleotiide lähtudes varasemast praktikast.

Lisaks testisime hüpoteesi, et mRuby2 ja vastuvõtja vektori ligeerimise aeg ei pruugi olla optimaalne, kuna erinevate protokollide järgi teostatakse ligeerimist 1-24 tundi. Varieeriti erinevaid ligeerimise aegu (1, 16 ja 24 tundi), kuid kõikidel kordadel toimus vastuvõtja-plasmiidi iseeneslik kleepumine ning soovitud produkti Colony-PCR analüüsil ei teostatud.

mRuby2 kloneerimist vastuvõtja vektorisse teostati kokku 6 korda, kus iga kord varieeriti parameetreid ning teostati analüüs Colony-PCR või DNA sekveneerimisel. Iga katsetus on

kogukestvusega 3 päeva: 1. päeval oligonukleotiid-suunatud saitspetsiifiline mutagenees, produkti ja vastuvõtja vektori restriksioon, DNA fragmentide eraldamine ja puhastamine ning ligeerimine; 2. päeval E.coli rakkude transformeerimine ligeerimisseguga; 3. päeval Colony-PCR ja kvalitatiivne geelelektroforees. Edasised katsetused (nt. uue SAP ensüümi tellimine, uute praimerite tellimine ja ligeerimisaja edasine optimeerimine) jäid käesoleva töö ajalisest mahust välja ning need on vajalik teostada lähitulevikus.

Clover-Epac-mRuby2 testimine

Kuigi töö käigus ei õnnestunud soovitud lõpp-produkti ehk Clover-Epac-mRuby2 biosensori konstrukti saada, planeeriti projekti alguses ka uue biosensori iseloomustamise strateegia. Uut konstrukti sisaldav plasmiid paljundatakse ning puhastatakse. Seejärel viiakse plasmiid spetsiaalsete reagentide abil eukarüootsetesse rakkudesse, kus toimub biosensorit kodeeriva geeni ekspressioon. Kui veendutakse biosensori valgu olemasolus, on võimalik teostada funktsionaalseid testimisi elusrakkudes. Uut biosensorit testitakse ensüümi AC aktiveerimise kaudu tõstes selliselt rakkude cAMP kontsentratsiooni. Kui biosensor osutub cAMP suhtes tundlikuks, siis uuritakse raku cAMP taseme muutusterinevate GPCR aktiveerimise kaudu. Hindamaks uue FRET paari efektiivsust (kiirus, tundlikkus, dünaamiline ala) võrreldakse tulemusi eelmiste olemasolevate biosensoritega samades rakkudes.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös kirjeldati G-valkudega seotud retseptorite poolt vahendatud signaaliradasid, keskendudes eelkõige sekundaarsele virgatsainele cAMP-le. Tutvustati erinevaid cAMP määramise meetodeid, pikemalt peatuti FRET-l baseeruvate biosensoritel ning nende arengu ajalool. Tutvustati erinevaid fluorestseeruvaid valke, nende olulisi omadusi ning viimaste parandamise kaasaegseid saavutusi. Tutvustati praktilise töö eesmärki Clover ja mRuby2 FRET paari kasutamist cAMP sensori loomisel. Fluorofooride paar valiti lähtudes mitmete teiste sensorite omaduste olulisel parandamisest just nende fluorofooride kasutamisel (Lam *et al.* 2012).

Töö praktilises osas tutvustati uue biosensori Clover-Epac-mRuby2 loomise strateegiat ning selleks disainitud praimereid.

Uue biosensori konstrueerimine toimus kahes etapis. Esimeses etapis vahetati olemasolevas ^TEpac^{VV} biosensoris (Klarenbeek *et al.* 2011) doonorfluorofoor eredalt rohelise fluorestseeruva valguga Clover vastu. Saadud uus Clover-Epac-dVenus konstruktsioon puhastati ning sekveneeriti.

Teine etapp kujutas endas Clover-Epac-dVenus konstruktsioonis aktseptor-fluorofoori vahetamist punase fluorestseeruva valguga mRuby2 vastu. Teine etapp ei olnud edukas. Tõrke välja selgitamiseks teostati erinevaid teste ja optimeeriti mitmeid katsetingimusi. Kahjuks Clover-Epac-mRuby2 konstruktsiooni siiski saada ei õnnestunud. Autor andis ülevaate võimalikest järgmistest sammudest ning töö eesmärgi saavutamise suunas jätkub.

Cyclic adenosine monophosphate biosensor development

Rainer Elp

SUMMARY

The theoretical part of the thesis describes signaling pathways mediated by G protein-coupled receptors, mainly through the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Different methods for detecting cAMP levels are described, with a more detailed description of FRET-based biosensors and their development. Various fluorescent proteins are introduced and an overview is given of their important characteristics and recent improvements. The use of Clover and mRuby2 as the FRET pair for cAMP biosensor is described. The FRET pair was chosen based on improvement of several biosensors after replacing existing fluorophores with Clover and mRuby2.

The experimental part of the thesis describes the strategy for creating Clover-Epac-mRuby2 biosensor, including the designed primers. The creation of the new biosensor was conducted in two parts. First, the donor fluorophore of the existing ^TEpac^{VV} biosensor was replaced with the bright green fluorescent protein Clover. The new Clover-Epac-dVenus construct was purified and sequenced. The acceptor fluorophore of Clover-Epac-dVenus was then attempted to be replaced by a red fluorescent protein mRuby2. The replacement of dVenus was alas unsuccessful. In an attempt to solve the issues, different tests and optimizations were conducted, but the final Clover-Epac-mRuby2 construct has not yet been obtained. The author gives an overview of possible further steps and the work for cloning the biosensor continues.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, Stephen R., Alec T. Harootunian, Ying Ji Buechler, Susan S. Taylor, and Roger Y. Tsien. "Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells." *Nature* 349, no. 6311 (1991): 694-697.
- Brooker, Gary, J. F. Harper, W. L. Terasaki, and R. D. Moylan. "Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP." *Advances in cyclic nucleotide research* 10 (1978): 1-33.
- Cheng, Xiaodong, Zhenyu Ji, Tamara Tsalkova, and Fang Mei. "Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors." *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40, no. 7 (2008): 651-662.
- de Rooij, Johan, Holger Rehmann, Miranda van Triest, Robert H. Cool, Alfred Wittinghofer, and Johannes L. Bos. "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs." *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 27 (2000): 20829-20836.
- Dieffenbach, C. W., T. M. Lowe, and G. S. Dveksler. "General concepts for PCR primer design." *PCR Methods Appl* 3, no. 3 (1993): S30-S37.
- Donaldson, J. I. L. L., STEPHEN J. Hill, and ANTHONY M. Brown. "Kinetic studies on the mechanism by which histamine H1 receptors potentiate cyclic AMP accumulation in guinea pig cerebral cortical slices." *Molecular pharmacology* 33, no. 6 (1988): 626-633.
- Filmore, David. "It's a GPCR world." *Modern drug discovery* 7, no. 11 (2004): 24-28.
- Gancedo, Juana M. "Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life." *Biological Reviews* 88, no. 3 (2013): 645-668.
- Gilman, Alfred G. "A protein binding assay for adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 67, no. 1 (1970): 305-312.
- Giraldo, Jesus, and Jean-Philippe Pin, eds. *G protein-coupled receptors: From structure to function*. No. 8. Royal Society of Chemistry, 2011.
- Goedhart, Joachim, Laura van Weeren, Mark A. Hink, Norbert OE Vischer, Kees Jalink, and Theodorus WJ Gadella. "Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening." *Nature methods* 7, no. 2 (2010): 137-139.
- Harper, J. F., and G. Brooker. "Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution." *Journal of cyclic nucleotide research* 1, no. 4 (1974): 207-218.

- Hill, Stephen J., Jillian G. Baker, and Stephen Rees. "Reporter-gene systems for the study of G-protein-coupled receptors." *Current opinion in pharmacology* 1, no. 5 (2001): 526-532.
- Jiang, Lily I., Julie Collins, Richard Davis, Keng-Mean Lin, Dianne DeCamp, Tamara Roach, Robert Hsueh et al. "Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway." *Journal of Biological Chemistry* 282, no. 14 (2007): 10576-10584.
- Joly, Erik, Benoit Houle, Pierre Dionne, Sean Taylor, and Luc Ménard. "BRET 2 TM: Bioluminescence Resonance Energy Transfer, a Novel Assay Technology to Examine G Protein-Coupled Receptor Activation in Live Cells."
- Klarenbeek, Jeffrey B., Joachim Goedhart, Mark A. Hink, Theodorus WJ Gadella, and Kees Jalink. "A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range." *PLoS One* 6, no. 4 (2011): e19170.
- Lakowicz, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2007.
- Lam, Amy J., François St-Pierre, Yiyang Gong, Jesse D. Marshall, Paula J. Cranfill, Michelle A. Baird, Michael R. McKeown et al. "Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins." *Nature methods* 9, no. 10 (2012): 1005-1012.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. "Lehninger principles of biochemistry. 2005."
- Nagai, Takeharu, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba, and Atsushi Miyawaki. "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications." *Nature biotechnology* 20, no. 1 (2002): 87-90.
- Naylor, Louise H. "Reporter gene technology: the future looks bright." *Biochemical pharmacology* 58, no. 5 (1999): 749-757.
- Nikolaev, Viacheslav O., and Martin J. Lohse. "Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells." *Physiology* 21, no. 2 (2006): 86-92.
- Nikolaev, Viacheslav O., Moritz Bünemann, Lutz Hein, Annette Hannawacker, and Martin J. Lohse. "Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation." *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 36 (2004): 37215-37218.
- Okumoto, Sakiko, Alexander Jones, and Wolf B. Frommer. "Quantitative imaging with fluorescent biosensors." *Annual review of plant biology* 63 (2012): 663-706.
- Overington, John P., Bissan Al-Lazikani, and Andrew L. Hopkins. "How many drug targets are there?." *Nature reviews Drug discovery* 5, no. 12 (2006): 993-996.

- Patrick, Graham L. *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford university press, 2013.
- van der Krogt, Gerard NM, Janneke Ogink, Bas Ponsioen, and Kees Jalink. "A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example." *PloS one* 3, no. 4 (2008): e1916.
- Wettschureck, Nina, and Stefan Offermanns. "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiological reviews* 85, no. 4 (2005): 1159-1204.
- Williams, Christine. "cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest." *Nature Reviews Drug Discovery* 3, no. 2 (2004): 125-135.
- Willoughby, Debbie, and Dermot MF Cooper. "Live-cell imaging of cAMP dynamics." *Nature methods* 5, no. 1 (2008): 29-36.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks järelõpetööüldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rainer Elp,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
TSÜKLILISE ADENOSIINMONOFOSFAADI BIOSENSORI ARENDAMINE

Mille juhendaja on Olga Mazina, MSc,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 05.06.2018 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2015